Nº 20. F. E. Lehmann und M. Henzen, Bern. — Zur Mikrocytologie der Meiose und Mitose von *Tubifex*.[1] (Mit 2 Textabbildungen und 2 Tafeln.)

Zoologisches Institut der Universität Bern.

Mitose und Meiose sind vorzüglich geeignete zellbiologische Modelle beim Ei des *Tubifex*. Hier wurden in den letzten 20 Jahren die Phänomene der mitostatischen Beeinflussung des Teilungsapparates durch Antimitotica studiert. Ferner gelang es uns, der mikrocytologischen Strukturbildung auf elektronenmikroskopischen Schnitten wesentlich näher zu kommen, da wir eine besser befriedigende Fixierungstechnik angewendet haben (s.u.). Wir mussten uns im Laufe der Jahre überzeugen, dass die cytologischen Strukturveränderungen während der Mitose allein nicht genügen, um eine ausreichende Vorstellung vom Mitosegeschehen zu entwickeln. Elektronenmikroskopische Strukturbilder sind unerlässlich.

Es kam uns schliesslich darauf an, die mikrocytologischen Bilder des Elektronenmikroskops mit den cytologisch gefärbten Schnitten des Lichtmikroskopes direkt zu vergleichen. So ist es uns in der Tat gelungen (Lehmann, Henzen, Geiger 1962), die cytologischen mit den mikrocytologischen Strukturen in Beziehung zu setzen.

Wir hatten uns in den letzten 20 Jahren bereits bemüht, durch cytologische Bilder von Meiose und Mitose die Mitosephysiologie bei Tubifex aufzuklären. Wir möchten nun im folgenden weitere Phänomene der Meiose und der Mitose mit mikrocytologischen und cytologischen Methoden untersuchen. Wohl werden sich die Gelkörper von Spindel und Aster optisch abgrenzen lassen, zugleich aber wird sich die Feinstruktur der Gelkörper und des Cytoplasmas als sehr komplex zusammengesetzt darstellen (Mikrosomen und Mikrofibrillen, Mitochondrien).

Der Ablauf der Meiose ist beim Tubifex-Ei eng verknüpft mit der Aussonderung zweier Endoplasmabezirke, der *Polplasmen*, die am Ende der Reifung, kurz vor der ersten Furchungsteilung

[1] Mit Unterstützung der Eidg. Kommission zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung aus Arbeitsbeschaffungsmitteln des Bundes.

an den beiden Eipolen als scharf begrenzte Plasmaanhäufungen in Erscheinung treten. Diese Polplasmen stellen eigentliche morphogenetische Plasmen dar: sie bestimmen die Ausbildung der ektodermalen bzw. mesodermalen Organanlagen. (Penners 1934, 1937). Es sind Zellbereiche, die sich durch gezielte Zentrifugierungen umschichten und dislozieren lassen (v. Parseval 1922, Lehmann 1940). Sie weisen ferner auch cytochemische und feinstrukturelle Besonderheiten auf: die positiv ausfallende Nadi-Reaktion zeigt das Vorhandensein von Cytochromoxydase, die ihrerseits an die Mitochondrien als Fermentträger gebunden ist (Lehmann 1941). Dass die Mitochondrien den integrierenden Bestandteil des Polplasmas bilden, war auf Grund der Nadi-Reaktion und an Hand der histologischen Bilder zu vermuten. Die mikrocytologische Untersuchung erbrachte dazu den Beweis (Lehmann 1950, Weber 1958).

Unter den vorhin erwähnten Gesichtspunkten sollen in dieser Mitteilung einige Beobachtungen zu den Vorgängen der Eireifung dargelegt werden.

Material und Methode

Die Eier, die sich aus der Institutszucht jederzeit beschaffen liessen, wurden mit feinen Pincetten aus den Coconhüllen befreit. Hatten die Eier noch nicht das gewünschte Stadium erreicht, wurden sie in die Lehmann-Zuchtlösung übergeführt und bei Zimmertemperatur bis zum gewünschten Entwicklungsstadium darin belassen. Als Fixiergemisch diente das Fixativ „E" (Lehmann-Mancuso 1958), eine saure, chromhaltige Osmiumlösung, die für Faserstrukturen und Mitochondrien gute Resultate liefert (Lehmann-Mancuso 1957). Für die histologischen Untersuchungen wurden die Keime in Agar vor- und in einer Asphalt-Gummiparaffinmischung definitiv eingebettet und in einer Dicke von 5-3 μ geschnitten. Zur Färbung diente eine Säurefuchsin-Lichtgrün-Lösung, die die Faserstrukturen, die Dotterpartikel und Mitochondrien gut zur Darstellung brachte.

Waren die Keime für die Untersuchung im Elektronenmikroskop (Typ Siemens Elmiskop) bestimmt, erfolgte nach der gleichen Fixierung die Einbettung in Metacrylat 8:2 oder in Vestopal W nach Kellenberger. Auf einem Porter-Blum Mikrotom wurden die Blöcke in einer Dicke von 0,07-0,1 μ geschnitten und die auf

Formvarfolien aufgezogenen Schnitte mit Bleiazetat kontrastiert (KARNOVSKY 1961).

ERGEBNISSE

a) *Meiose.*

Die erste Reifeteilung im Tubifex-Ei beginnt noch im Eisack des Muttertieres; im frisch abgelegten Ei befinden sich die Chromosomen bereits in der Metaphase. Die auf diesem Stadium durchge-

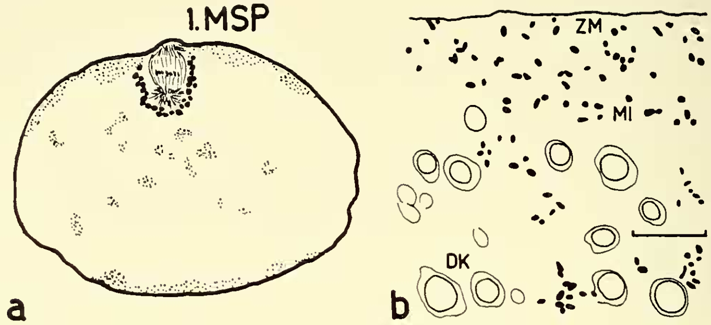


ABB. 1.

Ei kurz nach der Ablage; die Chromosomen befinden sich in der Metaphase der 1. meiotischen Teilung.

a) Schnittschema eines Paraffinschnittes. Meiosespindel (1. MSP), mitochondrienreiche Plasmainseln.

b) Ueberzeichnung einer elektronenmikroskopischen Aufnahme durch die Rinde. Das Ei wird nach aussen abgeschlossen durch die Zellmembran (ZM), dann folgt eine dünne Schicht Mitochondrien (MI) und schliesslich die groben Dotterkörner (DK) mit den gegen die Eimitte zu in Gruppen auftretenden Mitochondrien. Originalvergrösserung 1.000x. Masstabeinheit: 5 μ.

führte Nadi-Reaktion zeigt eine diffuse Blaufärbung der ganzen Eioberfläche. Anscheinend liegen die Mitochondrien in der Rinde verstreut. Unsere histologischen Schnitte haben gezeigt, dass, im Einklang mit den histochemischen Befunden, Mitochondrien in der dünnen Rindenschicht zu finden sind, dass aber der Hauptanteil des Polplasmamaterials als kleine Mitochondrieninseln zwischen den Dotterkugeln eingebettet liegt (Abb. 1) und somit bereits zu Beginn der Meiose in beträchtlichen Mengen im Innern des Eis segregiert ist.

Die hauptsächlichen Elemente des Spindelapparates sind mit Ausnahme der Centriolen mehr oder weniger deutlich zu erkennen; die Metaphasespindel der Meiose zeigt einen ausgeprägt fibrillären

Charakter und deckt sich gut mit dem Bild, das Inoué (1952) auf Grund seiner in vivo-Beobachtungen an Chaetopterus-Spindeln entworfen hat. Der ganze Meiosebereich weist praktisch keine Mitochondrien auf, aus dem umgebenden Cytoplasma reichen nur vereinzelte Lipoidtropfen zwischen die Fibrillen hinein (Tafel I). Die Spindel selbst zeigt zahlreiche lange, zum Teil parallel angeordnete Fibrillen.

Die Asteren sind, wie bei vielen Arten mit Spiralfurchung, recht grosse Strukturen, besonders auch bei den Mitosespindeln. Sie bestehen ebenfalls aus fibrillärem Material, das sehr schwach elektronenabsorbierend ist, und einer Anzahl dichter, mikrosomenartiger Partikel, die den Fibrillen aufsitzen. Am Metaphaseaster lassen sich zwei verschiedene Strukturbereiche abgrenzen: die Zone der Centrosphäre ist frei von jeglichen Partikeln; sie enthält ein sehr dichtes und eng übereinander gelagertes Retikulum. Die Peripherie weist sehr langgestreckte Fasern auf, die deutlich radial, zum Teil recht weit ins umliegende Plasma hinauslaufen.

Es wurde schon darauf hingewiesen, dass die Eiorganisation von *Tubifex* kurz vor dem ersten Mitoseschritt ihre deutlichste Gliederung erreicht mit der Ansammlung des Polplasmas an den beiden Eipolen. Es hat sich nun gezeigt, dass diese während der ganzen Meiose des Eis ablaufende Aussonderung des Plasmamaterials eng verknüpft ist mit ganz typischen Veränderungen der Eioberfläche: in rhythmischem Wechsel tritt parallel mit der Ausstossung der Richtungskörper ein bestimmtes Muster von Protuberanzen auf (Woker 1944). Zur Verteilung des Bildungsplasmas in diesem Stadium sind vor allem zwei Erscheinungen festzuhalten:

1. die Zahl der Plasmainseln verkleinert sich merklich und verschwindet schliesslich bis am Ende der zweiten Reifeteilung vollständig. Das Dottermaterial erscheint viel geschlossener und dichter.
2. gleichzeitig mit der Verminderung des mitochondrienhaltigen Plasmas im Eiinnern hat sich die Zone des subkortikalen Plasmas im Bereiche des Richtungskörpers und der Protuberanzen vergrössert.

Untersuchungen über die Verteilung von ungesättigten Fettsäuren im *Tubifex*-Ei (Hess 1959) — diese Fettsäuren sind als

Bausteine funktionell wichtiger Zellorganelle unter anderem auch in den Mitochondrien anzutreffen — ergaben, dass speziell die Stadien dieser Oberflächenunruhe sehr intensiv auf ungesättigte Fettsäuren reagierten, und zwar vor allem die Zonen der Protuberanzen. Es schien, dass dieses intensive Auftreten der Lipoide verknüpft sei mit einem vermehrten Auftreten von Mitochondrien. Unsere mikrocytologischen Bilder haben eindeutig ergeben,

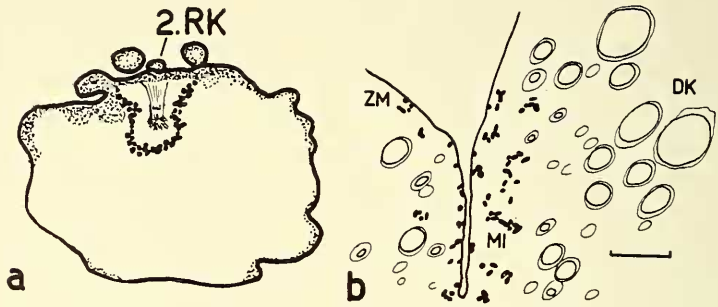


Abb. 2.

Die Oberflächenverformung während des Ausstossens des Richtungskörpers.

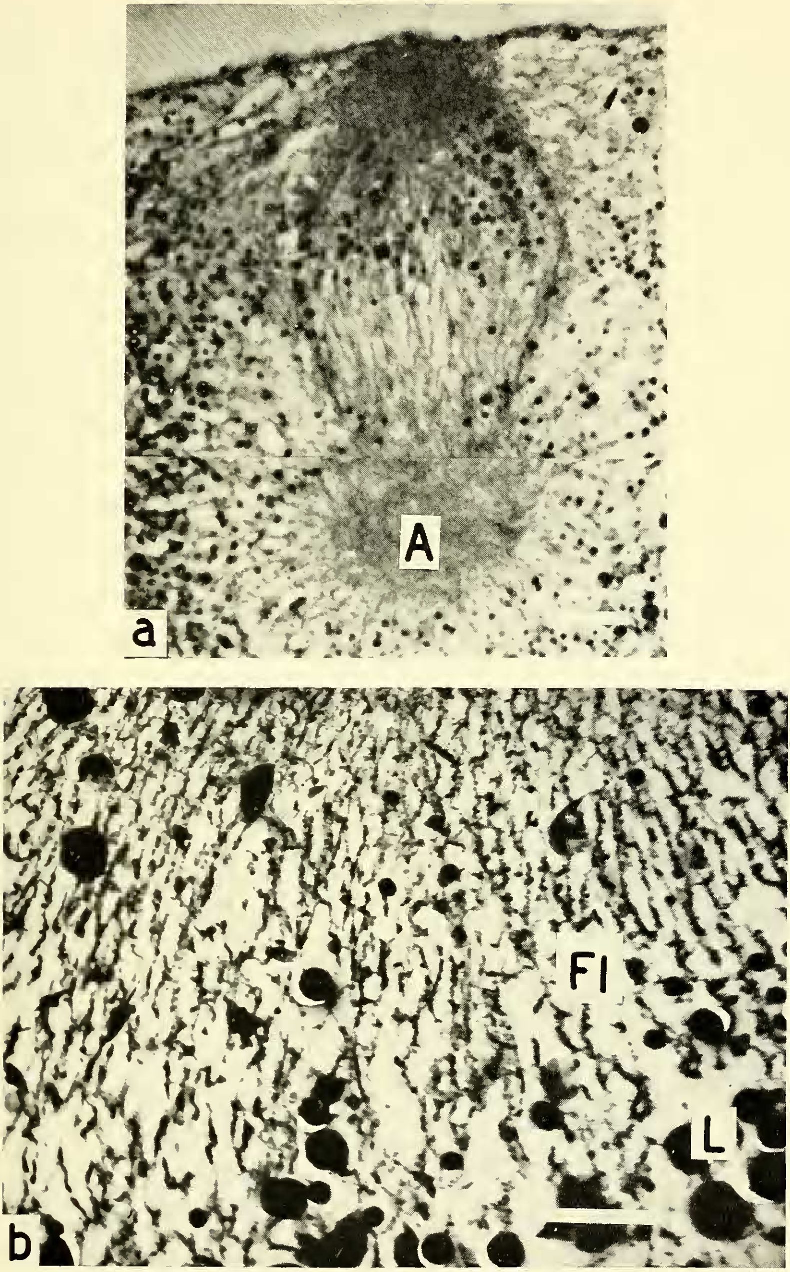
a) Schnittschema eines Paraffinschnittes. Die Mitochondrien sammeln sich unter der Rinde in der Nähe der Spindel und in den Ausbuchtungen der Protuberanzen an.

b) Das mikrocytologische Bild (Ueberzeichnung einer EM-Aufnahme) zeigt deutlich die in Gruppen zusammengezogenen Mitochondrien in einer Protuberanzenfurche. Originalvergrösserung 1.000x. Masstabeinheit: 5 μ. Bezeichnungen wie in Abb. 1.

dass sich in den Furchen der Protuberanzen die Mitochondrien ganz auffällig zu kleinen Gruppen ansammeln. Es scheint also so zu sein, dass während der wahrscheinlich viel Energie verbrauchenden Phasen der amöboiden Oberflächenunruhe die Mitochondrien als Träger eines ganzen Fermentmusters eine wesentliche Rolle spielen und deshalb unter dem Einfluss einer Rindenaffinität aus dem Zellinnern in die Zonen erhöhter Zellaktivität, d.h. der Richtungskörperaustrittstelle sowie der Ausbuchtungen verlagert werden (Abb. 2).

b) *Mitose.*

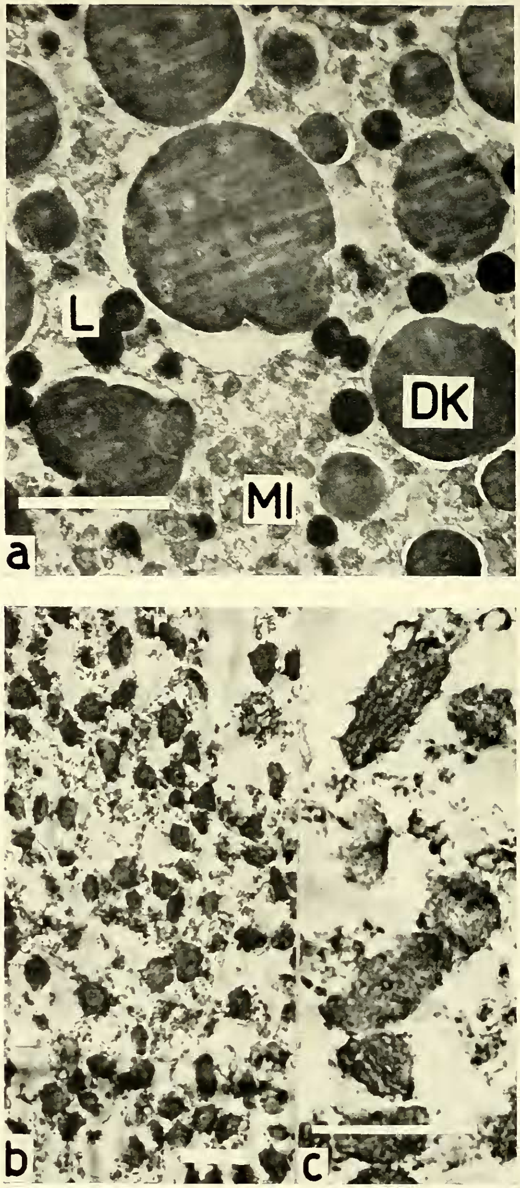
Vor der ersten Mitoseteilung ist die ooplasmatische Segregation der Polplasmen unter beträchtlicher Vermehrung des mitochon-



Aufbau und Struktur der Meiosespindel.

a) Paraffindünnschnitt zeigt die Fibrillenstruktur. Beide Asteren (A) sind ungefähr gleich gross. Lipoidtropfen sind als einzige Zellpartikel vereinzelt im Spindelbereich zu finden. Masstabeinheit: 10 μ.

b) Elektronenmikroskopischer Schnitt durch den peripheren Bezirk des zellinneren Asters. Deutlich sind die radial verlaufenden Fibrillen (FI) erkennbar. Die leichte Unschärfe ist bedingt durch den etwas dicken Schnitt. Originalvergrösserung 1.000x. Masstabeinheit: 5 μ.



Das Ei steht kurz vor der ersten Furchungsteilung und hat die Polplasmen abgegrenzt.

a) Em-Aufnahme aus dem Eiplasma: Dotterkörner mit Plasmahülle, Lipoidtropfen (L) und vereinzelte Mitochondrien, (MI). Originalvergrösserung 1.000x. Masstabeinheit: 5 μ.

b) Ausschnitt aus dem animalen Polplasma: dichte Mitochondrienpopulation. Originalvergrösserung 5.000x. Masstabeinheit: 1 μ.

c) Die Mitochondrien weisen eine aus Längskanälchen bestehende Feinstruktur auf. Originalvergrösserung 10.000x. Masstabeinheit: 1 μ.